

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 55-016203

(43)Date of publication of application : 04.02.1980

(51)Int.Cl. G01N 27/30

C12Q 1/00

G01N 27/46

G01N 33/00

(21)Application number : 53-084764 (71)Applicant : AJINOMOTO
CO INC

(22)Date of filing : 12.07.1978 (72)Inventor : SUZUKI
HIROSHI
HIKIMA
MOTOHIKO
YASUDA
TAKEO
KARUBE
MASAO
SUZUKI
SHUICHI

(54) MEASURING METHOD OF ACTIVITY OF MICROBE

(57) Abstract:

PURPOSE: To measure the activity of microbe with a simple means rapidly and exactly by measuring a decrease of dissolved oxygen or a production of acid on contacting the microbe electrode with reacted material.

CONSTITUTION: A microbe the activity of which is to be measured is cultivated in an ordinary culture medium. The bacteria are attached to a support such as millepore filter, the support is contacted with the diaphragm of

oxygen electrode and fixed with a net. The microbe electrode 1 is set on the flow-cell 3, which is provided with the rotor 5 and magnetic stirrer 4, through the packing 2. A carrier such as water is fed to the system from the feed pipe 8 and air is done from the pipe 7. In this state, electrode current is recorded on the recorder 6 as the base line. After the base line is stabilized, aqueous solution of reacted material is fed from the sample inlet 9, the peak of electrode current that reduces according to the extent of activity to saccharides and organic acids is recorded on the recorder 6.

LEGAL STATUS

[Date of request for
examination]

[Date of sending the examiner's
decision of rejection]

[Kind of final disposal of
application other than the
examiner's decision of
rejection or application]

converted registration]

[Date of final disposal for
application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against
examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal
against examiner's decision of
rejection]

[Date of extinction of right]

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑭ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55—16203

⑤ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和55年(1980)2月4日

G 01 N 27/30

7363—2G

C 12 Q 1/00

7349—4B

G 01 N 27/46

7363—2G

発明の数 1

審査請求 未請求

33/00

(全 4 頁)

④ 微生物の資化性測定法

横浜市港北区仲手原 1—19—31

① 特 願 昭53—84764

② 発 明 者 軽部征夫

立川市富士見町 4—11—18

② 出 願 昭53(1978)7月12日

② 発 明 者 鈴木周一

東京都豊島区巣鴨 1—40—6

② 発 明 者 鈴木浩

川崎市幸区鹿島田 958

① 出 願 人 味の素株式会社

東京都中央区京橋一丁目 5 番 8 号

② 発 明 者 引馬基彦

横浜市瀬谷区三ッ境 158—26

② 発 明 者 安田武夫

明 細 書

1. 発明の名称 微生物の資化性測定法

2. 特許請求の範囲

資化性を測定しようとする微生物を酸素電極又は複合ガラス電極の隔膜近傍に取りつけた微生物電極を被資化性を測定しようとする物質の水溶液に接触せしめ、該微生物の活動により生じる酸素の減少又は酸素の生成量を測定することからなる微生物の資化性測定法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は微生物の資化性を電気化学的手段により簡単に効率よく測定する方法に関する。

従来、微生物の資化性を測定する方法は、一般にはその微生物が被資化性物質のみを添加すれば生育できる最少栄養培地を調整し、この培地に被資化性を測定しようとする物質(被資化性物質)を添加し、微生物を接種して 24～72 時間培養を行い、微生物の生育又は酸生成の有無を判定することによつて行われる。この従来法は複雑な培地の調整及び厳重な無菌操作を必要とし、培養に長時間を要し、その上、資化性の判定には専門的な知識、技術が必要である。そこで本発明者らは微生物の資化性を迅速で正確に、かつ簡単な操作で、測定する方法を開発すべく種々研究を重ねた結果、資化性を測定しようとする微生物を電極に取りつけた微生物電極を被資化性物質と接触せしめた際、該微生物の活動によつて引き起こされる酸素消費量の減少又は酸生成の有無(又はその割合)が微生物と良く一致することを発見し、本発明を完成させるに至つた。以下本発明について説明する。

まず資化性を測定しようとする微生物を通常の栄養培地で培養する。培養法は固体培養、液体培養いずれでも良く、固体培養(スラント培養で十分)法では固体培地上に生育した微生物菌体をそのまま用いることができる。液体培養の場合には培養液から微生物を一括分離し、扱すれば洗浄して使用される。

次に微生物菌体を細かい口紙片、ミリポアフィルター等の被資化性物質は自由に通すが微生物菌体は通過させない程度の微細孔を有する担体に懸

間を装し、その上、資化性の判定には専門的な知識、技術が必要である。そこで本発明者らは微生物の資化性を迅速で正確に、かつ簡単な操作で、測定する方法を開発すべく種々研究を重ねた結果、資化性を測定しようとする微生物を電極に取りつけた微生物電極を被資化性物質と接触せしめた際、該微生物の活動によつて引き起こされる酸素消費量の減少又は酸生成の有無(又はその割合)が微生物と良く一致することを発見し、本発明を完成させるに至つた。以下本発明について説明する。

布しこれを電極の隔壁近傍に第1図のように取りつける。第1図は本発明で用いる微生物電極の1実施形態を示すもので、1は微生物層、2は担体、3はネット、4は××××隔壁、5は白金カソード、6はアルミニウムアノード、7は塩化カリウム液、88'は輪ゴムである。3のネットは2の担体を固定化するためのものでガーゼ、ナイロンネット等で十分である。

微生物電極を被酸化性物質の水溶液と接触させると、被酸化性物質は微生物と接触し酸化される。酸化されない場合には何ら変化は起らないが、酸化されると酸素消費量が消費され、又は酸が生成される。

酸素消費量及び酸の生成量は微生物の酸化能の強さに対応している。そこで酸素消費量又は酸の生成量をグルコース、グルタミン酸等を基準として換算することにより酸化性を数値化することができる。

酸化性測定の際、pHは酸化性を測定しようとする微生物の生育に適した範囲であれば良く測

定時は被験液の酸素消費量は一定に保つ必要があり、酸素消費量を一定にすることが望ましい。

又、酸素消費量の減少量及び酸生成量は被酸化性物質の濃度にも依存しているので一定の濃度で測定することが望ましくその濃度は10~200ppmで十分である。

酸化性測定の際の微生物電極と被験液との接触時間は5~15分で十分であり、非常に短時間で測定でき、第2図のようなシステムで連続的に測定できる。連続的に測定する場合1サンプルの測定に要する時間は約30分である。

上述のように本発明の方法は特定の栄養培地を必要とせず、無菌操作を要せず1試料を30分以内の短時間で測定でき、しかも、微生物の酸化性の判定に専門的知識を要せず酸化電極を自動的に数値化できるので極めて簡便である。

以下実施例にて詳細に説明する。

実施例1

バチルスズブチリス ATCC 6051をブイヨン寒天スラント培地で30℃、24時間スラ

- 3 -

ント培養を行った。

スラント上に生育した細菌*体を白金耳取りこれを直径15mmのミリポアフィルター(孔径0.45μ)に濾布したものを用いて、その上をナイロンネットで包囲し、上部を輪ゴムで固定化し第1図に示すような微生物電極を作製した。

この微生物電極をフローセルにセットし、第2図に示すような連続測定システムを作製した。

第2図中、1は微生物電極、2はバツキング、3はフローセル、(容量5.0ml)、4はマグネツクスターター、5は回転子、6はレコーダー、7は空気供給管、8はキャリア液(水)供給管、9はサンプル注入口である。

酸化性を測定する際には、まずこの系内に0.01M pH5.5のリン酸緩衝液又は水をキャリア液として流し(5ml/min)、空気を2.0l/minで吹き込みフローセル内の温度は30℃に調節する。この状態で電極電位をベースラインとしてレコーダーに記録し、ベースラインが安定化した後、サンプル供

- 4 -

給口から各種の糖類及び有機酸類の水溶液(50ppm)を30分、間隔を置いて流量5.0ml/minで5分間注入した。サンプルを注入すると電極電位は直ちに減少を始め、各物質の酸化性の強さに応じたピークがレコーダーに記録された。

シュドモナスエルゲノサ ATCC 10145についても全く同様の方法で酸化性を測定し第1図に示す結果を得た。

第1表は上記2菌株の各種糖類及び有機酸の酸化性の強さをグルコースを基準物質(グルコース50ppmのピークの高さを100%)として表示したものであるが、従来法(糖類は酸生成度、有機酸は微生物の生育度で判定)で測定した結果と良く一致している。

- 5 -

- 22 -

- 6 -

第1表 酸化性測定結果

被酸化性物質	ハンゼラアノマラ		ショートモナス・エルギノサ	
	従来法	電極法	従来法	電極法
グルコース	+	100	+	100
トレハロース	+	56	-	0
キシロース	+	2	+	5
L-アラビノース	+	9	-	0
マニトール	+	36	-	0
シュクロース	+	48	+	7
ラクトース	-	0	-	0
乳酸	+	130以上	+	65
コハク酸	+	130以上	+	20
クエン酸	+	16	-	0

実施例1

エルスコフィア トルバーダ ATCC

25835をブイヨン寒天スラントで培養し(30℃、48時間)、スラント上に生育した放線菌の菌体を1/2白金耳取り、これを実施例1と同様にリボアフィルターに散布し、これをガルバニック

- 7 -

ラクトース	+	7
セロビオース	+	45
マルトース	+	47
乳酸	+	52
コハク酸	+	4

実施例3

ハンゼラアノマラ CBS 5759及びアスベルギウス ニガー ATCC 6275を第3表の寒天培地で30℃、48時間スラント培養を行った。

第3表 酵母・カビ用寒天培地(pH6.8)

成分	含量
ペプトン	0.3 g/2L
酵母エキス	0.3 "
酵母エキス	0.3 "
グルコース	1.0 "
寒天	2.0 "

スラント上に生育した微生物菌体を1/2白金耳取り、実施例2と同様の方法で微生物電極を作製し、第

- 9 -

4タイプの微生物電極の隔壁近傍に取り付け、その上をナイロンネットで包い上部を電極本体に輪ゴムで固定化し第1図のような微生物電極を作製した。この微生物電極を用い第2図の測定システムにより酸化性を測定した。その結果は第2表に示すとおりである。

第2表 放線菌の酸化性測定結果

被酸化性物質	従来法	電極法
グルコース	+	100
トレハロース	+	23
キシロース	+	18
L-アラビノース	+	7
ラマンノース	-	0
フラクトース	+	7
ガラクトース	+	10
ラフィノース	-	0
マンニトール	-	0
サリシン	+	13
シュクロース	+	64

- 8 -

2図の測定システムにより各菌株の酸化性を測定した。その結果を第4表に示す。

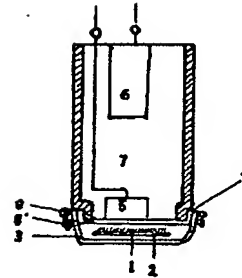
第4表に示すように本発明の方法で測定した結果は従来法(酸生成法、生育度)の結果と良く一致している。

第4表 酵母、カビの酸化性測定結果

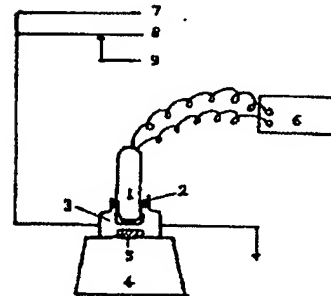
被酸化性物質	ハンゼラアノマラ		アスベルギウス ニガー	
	従来法	電極法	従来法	電極法
グルコース	+	100	+	100
ガラクトース	+	35~60	+	38
シュクロース	+	45~70	+	43
マルトース	+	15~20	+	62
ラクトース	-	0	-	0
L-ソルギース	-	0	+	47
セロビオース	+	8~20	+	60
トレハロース	+	3~18	+	46
メリビオース	-	0	+	18
ラフィノース	+	2~10	+	9

- 10 -

第 1 図



第 2 図



ノリズイトース	+	3~4	+	9
キシロース	+	10~15	+	22
レ-アラビノース	-	0	+	9
D-アラビノース	-	0	+	22
リボース	W	0~3	+	4
レ-ラムノース	-	0	+	22
D-マンニトール	+	17~40	+	26
リルビトール	+	1~17	+	14
サリシン	+	5~7	+	31
乳 酸	+	8~9	+	9
コハク酸	+	6~40	+	31

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明で用いる微生物電極の概略図であり、第2図は微生物電極を用いて連続的に変化性を測定するためのシステムである。

特許出願人 味の素株式会社